

粳稻杂交育种中应用花粉植株 的某些优点和存在问题

胡 忠 黄仕周 李 聪

(中国科学院昆明植物研究所) (昆明市前卫公社南坝生产大队)

摘 要

1976 年用花药培养方法从粳稻 F_1 杂种获得 600 余丛花粉绿苗, 诱导率平均为 5%。在长成的花粉植株中, 自发加倍的二倍体约占 50%。

在生长于温室的自发加倍二倍体花粉植株 (H_1) 与生长于大田的后代 (H_2) 之间, 观察到抽穗日期有显著相关 ($n=37$, $r=0.714$), 千粒重有相关但不显著 ($n=37$, $r=0.301$), 结实率无相关, 这种情况部分与花粉植株 H_1 的倍数性混乱有关。

114 个花粉植株 H_2 株系中只有二个株系出现明显分离。由一个 F_1 杂种产生的花粉植株之间, 性状的变异很宽, 数量性状呈连续正态分布, 超亲变异很明显。相当部分株系的抗稻瘟病性劣于亲本。

从二个 F_1 杂种的 78 个花粉植株中选出二个有良好耐寒性与抗稻瘟病的品系。对它们的农艺性状进行二年观测, 未见生活力衰退。

认为, 由粳稻杂种 F_1 所培养的花粉植株的纯合性与类型多样性有利于优良重组体的准确选择与迅速稳定, 目前主要是产生二倍体花粉植株的效率太低限制了花粉植株有成效地应用。

1968 年以来, 人们用花药培养方法已经成功地将水稻小孢子诱导成植株, 其中一部分是培养过程中自发加倍的纯合二倍体。如果在水稻杂交育种中采用这一技术, 从 F_1 杂种产生的花粉植株中选择直接得到优良的纯系, 与常规程序从 F_2 群体中选择并通过多代自交获得纯系相比, 可望大大缩短育种周期。近年来, 我国各地大量地进行着这种试验, 已经报道成功地利用这种方法得到几个供生产上应用的粳稻新品种, [1,2,3] 对水稻花粉植株的遗传学表现进行了分析。[4,10] 然而与对花药培养单倍体育种持乐观态度相反, 一些育种家对能否通过花粉单倍体育种培育出优良水稻品种表示怀疑。我们在 1976 年用花药培养方法从 10 个 F_1 杂种得到 600 多丛花粉植株, 对自然加倍结实的 114 个花粉植株株系进行了选择, 得到二个可供生产上试用的抗稻瘟病品系。本文报道这一育种周期的工作, 并就试验结果分析、讨论目前粳稻杂交育种中应用花粉植株的某些优点和存在的问题。

试验材料与方法

供花药培养的粳稻杂交材料是根据昆明地区水稻育种目标配制的。影响该地区水稻产量的主要因素是 7、8 月份水稻生育后期的天气阴雨降温 and 稻瘟病危害。虽然水、肥条件优越, 大面积亩产仍停留在 900 斤左右。生产上要求提供稳产在每亩千斤以上的新

品种。供试杂交组合主要是二个。一是(城堡1号 $\times$ 云梗9号) F_1 , 目的是在当地推广的具有良好的耐寒性的品种云梗9号中引入具有广谱抗稻瘟病基因的日本城堡1号的抗病性。二是($A_{22} \times$ 晋宁2号) $\times$ 70111, 70111是由西南175 $\times$ 麻早产生的选系, 具有较好的抗病性与耐寒性, 企图在其中引入 A_{22} 的矮秆和晋宁2号大穗等丰产性状。

1976年7月从正常季节栽种于大田的杂种植株上取花药培养。采用常规的固体培养方法, 以 N_0 为基本培养基^[5], 附加2,4-D诱导出花粉愈伤组织, 转到附加NAA和动力精的培养基上分化出苗。也用我们的改进方法^[6], 花药在培养液表面漂浮经8 $^{\circ}\text{C}$ 低温处理4天后转到附加NAA和动力精的培养基上培养出愈伤组织并分化出苗。花粉绿苗经壮苗后于同年11月同时移栽在温室中生长。第二年春季收获自然结实的花粉植株种子, 对每丛结实花粉植株(H_1)的主穗的各个性状作观察记录。

花粉植株种子在1977年正常季节栽种于大田, 每个株系(H_2)为50—150个单株, 高水、肥条件, 密度4万株/亩。每个株系抽样10株, 记录其主穗的各种性状, 对数量性状作统计分析。抗病性以田间自然感染叶稻瘟和穗稻瘟的程度表示。“—”, 10%以下感染, “+”, 10—25%感染, “++”, 25%以上感染。试验地(南坝四队)为稻瘟病重发区。根据育种目标, 1977年从98个株系中选出5个株系, 这些株系在1978年以2分田面积进行测产和农艺性状鉴定, 从中选出二个品系76-30和76-14, 这二个品系在1977年各以约9亩与6亩面积多点试种测得在不同栽培条件下的产量水平。

试验结果与分析

一、花粉植株的培养效率

几个梗稻杂交材料花粉植株诱导频率见表1。按常规花药培养方法, 绿苗的诱导率(以花药为基数)约为5%, 按改进方法, 可达10%, 而且出苗整齐。五个(梗 $\times$ 粳) F_1 杂种的花粉绿苗诱导率平均低于1%, 主要是愈伤组织分化率太低, 白化苗太多。

花粉绿苗移栽的成活率大约为50% (见表2)。在长成的植株中结实的二倍体约占50%, 单倍体约占40%, 其他为多倍体。

观察到个别由一块愈伤组织分化的一丛花粉植株出现二种不同性状的单株, 须注意分开以免相互杂交导致后代出现分离。

水稻的多倍体于育种无用。单倍体植株各种性状均与二倍体迥然不同, 完全不能提供选择。虽然用秋水仙碱处理单倍体植株的分蘖节或生长点可以诱导高的加倍率^[4], 但这样做拖延一个生长季节, 而且处理大量单倍体植株的工作量太大, 实际难以进行。因此, 单倍体与多倍体花粉植株均丢弃。

以上试验结果表明, 即使对于最容易培养的梗稻杂种, 用常规培养方法, 要从一个杂交组合得到50份花粉植株的种子供选择, 必须培养2千枚以上花药。

二、花粉植株 H_1 是否能进行选择

用大田生长的材料培养出的花粉苗只能于冬春季节在温室中栽培结实。对自然加倍

表 1. 梗稻杂种F₁花药培养中花粉愈伤组织和花粉苗的诱导率
Table 1. Induction frequency of pollen callus and plantlets in anther culture of F₁ hybrids of rice (subsp. Japonica)

培 养 材 料 Materials	培 养 方 法 methods of anther culture	培养的花药数 No. of anther cultured	愈伤组织 诱导率 % Induction- frequency of callus %	愈伤组织分化率 %		绿苗诱导率 % Induction- frequency of green plantlets %
				绿苗 greens	白苗 albinos	
(城堡 1 号 × 云梗 9 号)	常规 Conventional	890	27.7	23.5	—	6.5
(A ₂₂ × 晋宁 2 号) × 70111	常规 Conventional	1022	16.3	23.1	9.3	3.8
	改进 Improved	890	48.0	27.1	2.8	13.0
(梗 × 粳) 五个 (Jap. × Ind.)	常规 Conventional	8027	10.4	1.5	3.1	0.2

表 2. 水稻花粉苗的移植成活率和花粉植株倍性水平
Table 2. The survival rate in planting and ploidy levels of pollen plants derived from rice F₁ hybrids.

培养材料 Materials	移植花粉苗数 No. of plantlets	成 活 植 株		单倍体 % Haploid (%)	二倍体 % Diploid (%)	多倍体 % Polyploid (%)
		数 Number	成活率 % Rate (%)			
城堡 1 号 × 云梗 9 号	58	35	60.2	22.8	67.8	8.4
(A ₂₂ × 晋宁 2 号) × 70111	277	120	43.4	50.8	45.8	3.4

结实的花粉植株能否进行选择关系到大田选择的工作量。我们对栽培于温室的花粉植株 H₁ 与其栽培于大田的后代 H₂ 在数量性状上是否存在相关作了观察与统计, 结果见图 1。各种不同性状相关程度各不相同。抽穗日期显著相关 (n = 37, r = 0.714**), 而结实率无相关 (n = 37, r = 0.1), 株高存在相关但不显著 (n = 37, r = 0.224), 千粒重也是这样情况 (n = 37, r = 0.301)。在统计的 35 株花粉植株中有 14 株感染稻瘟病, 这些植株的 H₂ 在大田中也感染, 但有些 H₁ 植株未见感染者其 H₂ 也感染。出现上述不同情况的原因是复杂的。温室的生长条件不正常, 而且变化的情况也与正常生长季不同。例如有些迟熟的花粉植株, 在温室中由于春末气温升高, 结实好, 但在大田中由于晚秋气温下降, 结实差, 这样就不能观察到相关。自发加倍的花粉植株 (H₁) 的倍数性混乱也是原因之一, 有些花粉植株结实率很低, 但不能淘汰, 它的后代 H₂ 则结实完全正常, 育性最明显地受倍数性影响。抽穗日期不同, 单倍体与二倍体之间未见显著差异。这样, 在 H₁ 与 H₂ 之间, 相关程度就高一些。因此, 在出苗整齐和温室栽培条件控制较好的情况下, 对花粉植株 H₁ 似乎也就能就不同性状进行部分选择。

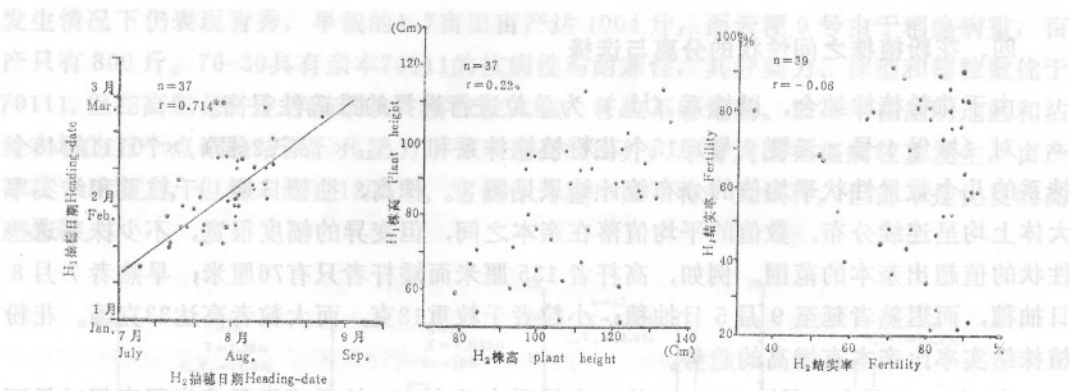


图 1 花粉植株H₁（种植于温室）与其后代H₂之间抽穗日期株高和结实率的相关性。

H₂是10个单株的平均值。材料：(A₂₂ × 晋宁 2 号) × 70111。

Fig. 1 Correlation of heading date, plant height and fertility between H₁ plants grown in green-house and their progenes H₂ grown in field. The values of H₂ were mean values which were made on examinations of 10 plants. Material: (A₂₂ × Zinnin 2) × 70111.

三、花粉植株的纯合性

对花粉植株 H₂ 株系几个数量性状的变异系数的测定结果见图 2，由杂种 (A₂₂ × 晋宁 2 号) × 70111 来的绝大多数株系，其株高、抽穗日期的变异系数都小于亲本。结实率也有类似情况。一部分株系结实率变异系数大的原因之一是它们严重地感染稻瘟病，结实率很低所致。这个组合的 54 个花粉植株株系没有一个出现明显分离。在考察的 114 个株系中出现显著分离的只有二个，其一是由杂交水稻诱导出的三个株系中的一个，其分离情况与常规 F₂ 相似，其二是由粳籼杂种 (科三 × 塔杜康) × 科三而来的一株系，只在育性、生育期和株高上显著分离，从中选出的单株其后代仍分离。由全部 114 个花粉植株 H₂ 中选出的 5 个株系，其后代 H₃ 表现分离的有一个，其中出现一部分低育性和生育期变化的植株。由此可见绝大多数花粉植株是纯合的。

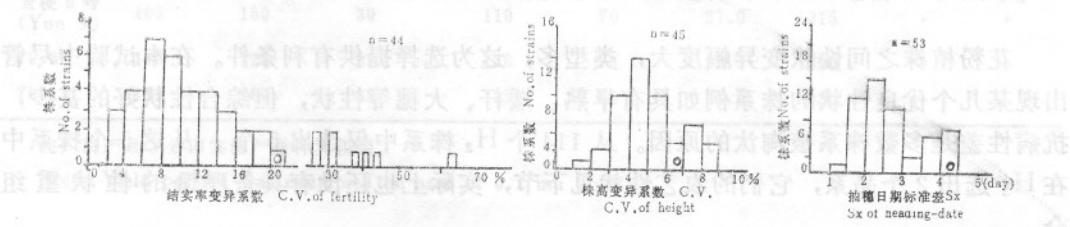


图 2 花粉植株H₂株系的结实率、株高和抽穗日期的变异系数的分布。

杂交组合 (A₂₂ × 晋宁 2 号) × 70111。每一株系的变异系数为 10 个单株的测定值。○表示 70111 的变异系数。

Fig. 2 Distribution of C. V. of fertility, plant height and heading date in H₂ strains of pollen plants derived from rice hybrid (A₂₂ × Zinin 2) × 70111. The C. V. of each strain was made on examinations of 10 plants, ○ represented C. V. of 70111.

四、花粉植株之间性状的分离与选择

由于花粉植株纯合，以株系 (H_2) 为单位进行选择的准确性很高。

对 (城堡 1 号 $\times$ 云梗 9 号) 15 个花粉植株株系和 ($A_{22} \times$ 晋宁 2 号) $\times$ 70111 的 48 个株系的几个数量性状平均值的分布统计结果见图 3。株高，抽穗日期、千粒重和结实率大体上均呈连续分布，数值的平均值落在亲本之间，但变异的幅度很宽，不少株系这些性状的值超出亲本的范围。例如，高秆者 135 厘米而矮秆者只有 76 厘米；早熟者 7 月 8 日抽穗，而迟熟者延至 9 月 5 日抽穗；小粒者千粒重 18 克，而大粒者高达 33 克等。花粉植株结实率比亲本有增高的趋势。

在 ($A_{22} \times$ 晋宁 2 号) $\times$ 70111 的 48 个株系中约有 $1/4$ 株系感染稻瘟病程度超过最不抗病的亲本，有 5 个株系出现亲本中未见的黄化萎缩病。但也有少数株系抗病性良好。有一部分株系落粒性严重程度超过亲本 A_{22} 的落粒性。在 (城堡 1 号 $\times$ 云梗 9 号) 的 15 个株系中只有 3 个抗病性与城堡 1 号那样良好，也同样表现晚熟。

表 3 是花粉株系与常规 F_2 群体在一组颖花的质量性状上分布情况的比较。花粉植株的分布比较分散，例如具有紫芒和颖片紫色者，在 F_2 中占 62%，而在花粉植株中只占 35%。

表 3. 从水稻 F_1 杂种培养的花粉植株 H_2 和 F_2 植株在颖花类型上分布的比较。材料: ($A_{22} \times$ 晋宁 2 号) $\times$ 70111

Table 3. Comparison of the distribution of glume types between H_2 strains of pollen plants and F_2 plants derived from rice F_1 hybrid ($A_{22} \times$ Zinnin 2) $\times$ 70111.

类 型	颖片色泽	颖尖色泽	芒 性	H_2 株 系		F_2 植 株	
Types	Colour of glume	Colour of glume tip	Awedness	数	%	数	%
				H_2 strains		F_2 plants	
				number	%	number	%
1	V	V	V	17	35.4	304	62.0
2	Y	Y	Y	7	14.6	6	1.2
3	Y	V	L	5	10.1	12	2.3
4		others		19	39.7	178	34.1

注: Note: V 紫色 Violet, Y 黄色 Yellow, L 无芒 Awedless.

花粉植株之间性状变异幅度大，类型多，这为选择提供有利条件。在本试验中尽管出现某几个优良性状的株系例如具有早熟、矮秆、大穗等性状，但综合性状好的甚少，抗病性差是多数株系被淘汰的原因。从 114 个 H_2 株系中仅选出 5 个，从这 5 个株系中在 H_3 选出 2 个品系，它们的农艺性状见下节，实际上也还没有具备理想的性状重组合。

五、二个花粉植株品系的农艺性状

对选出的二个花粉植株品系的农艺性状进行二年观察。表 4 是它们与主要亲本的对比。76-14 的分蘖力超过亲本，它具有亲本云梗 9 号的耐寒性和城堡 1 号的抗病性，但与城堡 1 号同样晚熟，粒重低于亲本，1979 年在昆明南坝大队试验，在周围稻瘟病严重

发生情况下仍表现青秀，早栽的1.7亩田亩产达1004斤，而云梗9号由于稻瘟病重，亩产只有800斤。76-30具有亲本70111的抗病性与耐寒性，其分蘖力、株型和穗粒数优于70111，但在高肥条件上容易倒伏，落粒性太强，籽粒不够饱满。1979年在昆明地区和沾益农场的五个点试验结果，凡肥力水平不过高的田外，尽管周围稻瘟病较重发生，亩产都在千斤以上，但均未超过1200斤。它们作为稳产品系将扩大试种，但都不是优良的高产品种。

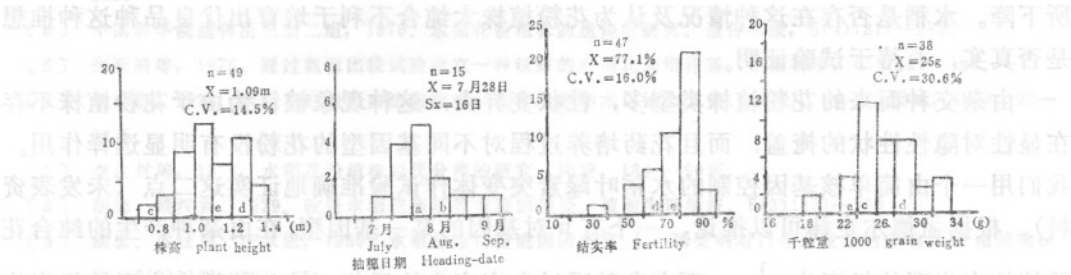


图3 由杂种F₁而来的花粉植株H₂株系几个性状的平均值的分布。每个株系的平均值为10个单株的测定值。a, b, c, d, e 各为杂交亲本：云梗9号、城堡1号、A₂₂、晋宁2号、70111的平均值。
Fig 3. Distribution of the mean value of certain characters in H₂ strains of pollen plants derived from rice F₁ hybrid. The mean value of each strain was made on examinations of 10 plants. a, b, c, d, e represented the mean value of parents Yun 9, Shiro, No. 1, A₂₂, Zinnin 2 and 70111 separately.

表4 二个花粉植株株系与它们的主要亲本之间农艺性状的比较
Table 4. Comparision of agronomic characters between two strains of pollen plants (76-14, 76-30) and their principal parents (Yun 9, 70111).

材 料	株 高	生育期	有效穗	穗粒数	结实率	千粒重	亩产*	感稻瘟病性	
Materials	Plant height	Duration	No. of effective ears per mu(×10 ⁴)	No. of total grain per panicle	Fertility	1000 grain-weight (g)	Yield per mu (catty)	叶	穗
	(cm)	(day)			(%)			Infection of blast disease	
	(cm)	(day)			(%)			leaf	panicle
76-14	110	190	42	109	75	17.2	1210	-	-
云梗9号 (Yun 9)	105	180	30	110	70	21.0	1015	+	+
76-30	110	175	27	138	74	22.5	1300	-	-
70111	112	180	22	115	80	23.0	930	-	-

注：亩产是1分田实测产量计算得到。
Note: Yield per mu was examined on area of 0.1 mu field.

讨 论

迄今进行的试验结果都证明，用花药培养方法由梗稻F₁杂种诱导的花粉植株绝大多数是纯合的。少数花粉植株后代发生分离的多属于育性变异，这与突变相似^[7]。用梗稻品种进行的诱变试验也表明^[9]，通过花药离体培养诱导的植株，其突变频率比 Oono

(1978)^[11]报道由种子胚诱导出愈伤组织所再生的植株的突变频率要低得多。花粉植株的纯合性显然有利于共组体的准确选出和迅速稳定。然而,花粉植株的纯合性是否引起生活力下降是令人怀疑的问题。正如本试验和其他研究表明的^[10],从 F_1 杂种产生的花粉植株中选出的纯合株系,其表明生活力的某些指标完全可能超过亲本。而且花粉植株连续自交的后代也没有表现生活力逐步衰退现象^[4]。但是,Dapaev等(1977)^[12]观察到由培养花粉产生的烟草纯系与由自交产生的同样烟草纯系相比,生活力的某些指标有所下降。水稻是否存在这种情况及认为花粉植株太纯合不利于培育出优良品种这种推想是否真实,有待于试验证明。

由杂交种而来的花粉植株类型多,性状变异大,这种现象被认为由于花粉植株不存在显性对隐性性状的掩盖,而且花药培养过程对不同基因型的花粉没有明显选择作用。我们用一个由简单核基因控制的水稻叶绿素突变体作试验准确地证实这二点(未发表资料)。根据孟德尔定律可以推论,一个有 n 对基因的某一基因型,在由杂种产生的纯合花粉植株中出现的机率为 $\frac{1}{2^n}$,而在杂种通过自交产生的后代(F_2)植株中出现的机率为 $\frac{1}{2^{2n}}$ 。因此,要出现一株这样基因型的植株所须的花粉植株数只有 F_2 植株数的 $\frac{1}{2^n}$,

例如 $n = 5$,那么32株纯合花粉植株就与1024株 F_2 植株相当^[13]。这表明,自花粉植株中选择效率很高。实际经验表明,自花粉植株中容易选出具有某一独特优良性状(如早熟、矮秆、大穗大粒等)的稳定材料,但目前很难获得具有综合性优良的材料,而这正是培育优良品种所希望的。目前我们把这种情况归委于:一方面是杂交组合选择不当,目前配交多凭经验,育种工作者较难提出不多几个组合就能保证这些组合是优良的;另一方面是由于每个组合提供选择的花粉植株数太少。

根据上述讨论,要利用花粉植株纯合性和多样性的优点较快培育出优良品种关键仍在于提供足够多的花粉植株供选择。尽管粳稻杂种的花药培养技术已有很大改进,但仍面临不少困难。由于只能以花药作为诱导单位,花粉愈伤组织的产生频率被限制在每枚花药一块愈伤组织的范围内;愈伤组织的分化绿苗率一般不超过50%,有的材料则很低;花粉植株中占40%之多的单倍体和多倍体实际上只能抛弃,而花粉植株的倍性一般须在植株长成后才能辨认,这就加重了温室栽培的工作量,大量植株在温室栽培,费用很高。为了降低费用,须要在培养过程中提高二倍体花粉植株的诱导率^[8]。除了改进花药培养操作效率外,要大幅度提高花粉植株诱导率需要打破花药壁的限制,使单个花粉或多细胞球花粉在突破花粉壁之前单独发育成植株^[8],这里面临的主要困难是花粉离开花药壁长成的愈伤组织其分化绿苗频率很低,这个困难也是目前水稻体细胞单细胞和原生质体培养中面临的困难,其解决尚有待于大量试验。

五、二个花粉植株品系的农艺性状

参 考 文 献

- [1] 天津市农科所水稻室等, 1976. 应用水稻花药培养育成水稻花育1号、2号. 遗传学报, 3(1):19—23.
- [2] 尹光初等, 1976. 用单倍体育种法育成水稻新品种的研究. 中国科学, (2):191—199.
- [3] 上海农业科学院作物研究所水稻研究组, 1976, 晚粳“新秀”是怎样培育成的, 植物学报, 18(3):245—249.
- [4] 中国科学院遗传所三室二组, 1976. 水稻花粉植株的遗传学研究. 遗传学报, 3(4):277—285.
- [5] 朱至清等, 1975. 通过氮源比较试验建立一种较好的水稻花药培养基. 中国科学, (5):484—490.
- [6] 胡忠等, 1978. 水稻花药培养方法的改进. 花药培养学术讨论会文集 (1977), 科学出版社, 1978, 93—98页.
- [7] 李良材等, 1978. 水稻花粉植株后代分离的研究. 同前, 184—190页.
- [8] 胡忠、梁汉兴, 1979. 改进水稻花药培养方法的途径. 植物生理学报, 5(2):131—139.
- [9] 胡忠、黄仕周、庄承纪, 1980. 水稻花粉白苗成因的研究 I, 诱变剂对白化苗发生的影响. 云南植物研究. 2(2):188—193
- [10] Chen-Ying, Li liang-tsai. 1978: Investigation and Utilization of Pollen-Derived Haploid Plants in Rice and Wheat. In: Proceedings of Symposium of Plant Tissue Culture. Science Press, Beijing, 1978, pp. 199—211.
- [11] Oono, K. 1978: High Frequency of Mutations in Rice Plants Regenerated from Seed Callus. Poster Demonstration of Proceedings of the 4th International Congress of Plant Tissue and Cell Culture, No. 1607.
- [12] Depaepe, K. et al. 1977: Potential from Haploid and Possible Use in Agriculture. In: Plant Tissue Culture and Its Biotechnological Application. ed. W. Barz et al, Springer-Verlage. pp. 341—352.
- [13] Straub, J. 1977: Theoretical Aspects of Haploid Techniques. *ibid.* pp. 334—340.

SOME ADVANTAGES AND PROBLEMS OF APPLYING THE POLLEN-DERIVED PLANTS TO CROSS BREEDING OF RICE (*O. sativa. subsp. japonica*)

Hu zhong Huang Shi-chou

(Kunming Institute of Botany, Academia Sinica)

Li Cong

(Nan-Ba Production Brigade, Qian-wei People's Commune, Kunming)

ABSTRACT

In 1976, six hundred green pollen plantlets from F_1 hybrids of rice were obtained by anther culture with an average induction-frequency of 5%. Spontaneous doubling diploids among grown plants was about 50%. Between the spon-

taneous doubling plants (H_1) grown in greenhouse and its progenes (H_2) grown in field, significant relation in heading date ($n=37$, $r=0.714$), no significant relation in grain weight ($n=37$, $r=0.301$), and no relation in fertility were found. This figure related partially to the more or less confusion in ploidy level of H_1 pollen plants.

114 strains of pollen plants (H_2) were homozygous except two segregated. Among different strains of pollen plants derived from one F_1 hybrid, the variation in characters were wider, the quantitative characters represented normal and continuous distribution, and transgressive variation occurred obviously. The blast-resistance of a part of strains was inferior to the parents.

Among 78 strains of H_2 Pollen plants derived from F_1 hybrid of two combinations, two strains with superior blast-resistance and hardiness were selected. Their agronomic characters were examined in following two years, no reduction in vitality was observed.

It was realized that the homozygosity and polytypism of pollen plants derived from F_1 hybrids of rice are of advantages for efficient selection and rapid stablization of new recombinations in cross breeding, and now it is the low efficiency of production of doubling pollen plants that restricts their effective application.

ABSTRACT